ownload from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentru

Über die Reinkultur der *Zoochlorella* aus *Euspongilla lacustris* und *Castrada viridis* Volz.

Von

Alfred Limberger

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der k. k. Universität in Wien, Nr. 116 der zweiten Folge

(Vorgelegt in der Sitzung am 6. Juni 1918)

I. Einleitung.

1. Historisches, Ziel und Plan vorliegender Arbeit.

Bald nachdem Wöhler im Jahre 1843 in Infusorien grüne algenartige Körperchen entdeckt hatte, fand Siebold dieselbe Erscheinung bei einer größeren Anzahl von Infusorien, bei Turbellarien und bei *Hydra*. Auf die grünen Inhaltskörper in den Zellen von Spongien wiesen einige Jahre später F. E. Schultze und K. Brandt (3) hin.

Über Art und Herkunft derselben waren die Ansichten geteilt. Der grüne Stoff wurde nach spektroskopischen Untersuchungen von Lankester (1), Brandt (2) und anderen als mit dem Chlorophyll der grünen Pflanzen gleich anerkannt, jedoch deuteten Geddes und Ray Lankester (1, 2) die grünen Gebilde als den Tieren arteigenes Chlorophyll, während in unabhängig voneinander durchgeführten Arbeiten Brandt (1, 2) und Entz (1) für die selbständige Zellennatur derselben eintraten. So wies Brandt (1) durch Färbung mit Hämatoxylin und Magdalarot in den grünen Körpern einen Kern nach. Von ihm rühren auch die Termini Zoochlorellen und

ownload from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentru

Phytozoen her, die seitdem in der Literatur gebräuchlich sind.

Brandt und Entz waren, soweit aus der Literatur ersichtlich ist, die ersten, die versuchten, auch auf physiologischem Wege Klarheit in das Zoochlorellenproblem zu bringen. So bemühte sich Brandt (1), farblose Infusorien und *Hydra grisea* mit den durch Auspressen aus *Spongilla* gewonnenen Chlorellen zu infizieren. Die Vermehrung freigelegter Algen konnte er nicht sicher konstatieren. Er fand aber, daß sie auch nach dem Tode der Tiere längere Zeit am Leben blieben.

Entz (1) wurde durch das Auftreten verschiedener Algengattungen in der Lösung, in der sich chlorophyllführende Infusorien befanden, veranlaßt, diese von den Zoochlorellen herzuleiten.

Das Verhältnis zwischen Tier und Alge dachten sich beide Forscher als Symbiose, als Zusammenleben mit gegenseitiger Förderung. Die Alge sollte Assimilationsprodukte liefern oder nach Entz (2) zum Teil verdaut werden, das Tier dagegen stickstoffhaltige Nährstoffe und Kohlensäure bieten. In dieser Ansicht wurde Brandt (1) durch Kulturversuche mit grünen Spongien in täglich filtriertem Wasser bestärkt.

Nach ihnen haben unter anderen Kessler (1882) mit *Hydra*, Schewiakoff (1889) mit den Zoochlorellen von *Frontonia leucas* — (ihm gelang nach seinen Angaben die Infektion farbloser Tiere mit Zoochlorellen, auch beobachtete er Vermehrung der Algen im hängenden Tropfen) — sowie Famintzin (1889) hauptsächlich mit Infusorien, *Stentor* und *Paramaecium*, endlich Haberlandt (1891) mit *Convoluta Roscoffensis* Versuche gemacht und ihre Beobachtungen mitgeteilt.

Famintzin gibt an, daß ihm die Isolierung und Züchtung der in Frage kommenden Zoochlorellen gelungen sei. Nach Haberlandt sind die Algen von *Convoluta* membranlos und gehen stets gleichzeitig mit dem Wurme zugrunde.

Zur Frage der biologischen Bedeutung des Chlorophylls bei Tieren wären noch die Untersuchungen L. v. Graff's

ownload from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentru

zu erwähnen, der nach Experimenten mit grünen und farblosen Hydren den Schluß zog, daß den Chlorellen für die Ernährung der Phytozoen, speziell für *Hydra* keine Bedeutung zufalle. Nach Pringsheim kann *Paramaecium Bursaria* von seinen Algen völlig ernährt werden. Wiewohl man heute ein symbiontisches Verhältnis zwischen Zoochlorellen und Phytozoen für ziemlich sicher hält, ist die Sache keineswegs genügend geklärt. Nach Oltmanns ist man »besonders bei den schwammbewohnenden Algen vollends im Unklaren über die Funktionen, welche einem der beiden Kommensalen zukommen«. Und Biedermann erklärt, daß »unsere Kenntnisse der biochemischen Bedeutung des tierischen Chlorophylls noch völlig unzulänglich sind«.

Alle von den genannten Forschern gemachten Versuche und Angaben über eine Vermehrung der Zoochlorellen außerhalb der Tiere entbehrten bei der damaligen geringen Ausbildung der Technik der Kultur von Mikroorganismen einer genauen Kontrolle und Präzision. Auch wurden den Algen keine besonders gewählten Ernährungsbedingungen geboten.

Beyerinck (1) wendete zuerst, wie bei der Kultur von Grünalgen überhaupt, so auch bei den Züchtungsversuchen mit Zoochlorellen die Koch'sche Methode der Isolierung an.

Auf seine Kulturversuche mit verschiedenen Zoochlorellen wurde ich auch bei der Zuweisung vorliegender Arbeit von Herrn Hofrat Professor Dr. Hans Molisch in erster Linie verwiesen und mit der Aufgabe betraut, die Zoochlorellen aus *Spongilla* zu kultivieren und die Naturgeschichte dieser Organismen genauer zu studieren.

Ich will nicht versäumen, gleich an dieser Stelle meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Hofrat Professor Dr. Hans Molisch für die stete Förderung meiner Arbeit und das freundlichste Entgegenkommen herzlichst zu danken.

Beyerinck's (1) dreimalige Bemühungen, die *Zoochlorella* von *Spongilla* in analoger Weise wie seine vorher kultivierte *Chlorella vulgaris* und das Hydrachlorophyll auf Gelatineplatten zu isolieren und zu züchten, mißlangen. »Schöne Pigmentbakterien, aber keine Chlorellen waren die

ownload from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentru

Frucht meiner Mühe gewesen.« Seither wurde der Versuch, soweit aus der Literatur zu ersehen ist [Richter O. (1, 2)], nicht wiederholt.

Plan und Ziel vorliegender Arbeit gehen aus dem bisher Gesagten und der Natur des Stoffes hervor.

Meine ersten Versuche mußten der Isolierung der Alge gelten, worauf dann nach erzielter absoluter Reinkultur die ernährungsphysiologischen Eigenschaften der *Zoochlorella* zu prüfen waren, um daraus eventuell Schlüsse auf ihr Verhältnis zur *Spongilla* ziehen zu können. Die Infektion von Natur aus algenfreier oder künstlich dazu gemachter Schwämme mit der in Kultur gehaltenen Alge zu bewirken, war als Abschluß der Arbeit gedacht.

Daß leider nur der geringere, aber vielleicht zeitraubendste Teil der gestellten Aufgaben gelöst werden konnte, wurde durch meine Einrückung zu Kriegsbeginn, eben als die ernährungsphysiologischen Versuche begonnen hatten, verursacht.

Auf das zweite Versuchsobjekt, ein chlorophyllführendes Turbellar des Lunzer Sees, wurde ich von Herrn Dr. Franz Ruttner aufmerksam gemacht und wurde mir dasselbe von ihm als *Castrada viridis* angegeben. Im Einverständnisse mit Herrn Hofrat Professor Molisch erstreckten sich meine weiteren Versuche auch auf die Zoochlorellen dieses Tieres, wobei Fragestellung und Durchführung die gleiche blieb wie bei *Spongilla*.

2. Material und Methodik.

Das notwendige Versuchsmaterial zur Arbeit bezog ich von der biologischen Station bei Lunz in Niederösterreich durch das liebenswürdige Entgegenkommen des Herrn Dr. Franz Ruttner, dem ich dafür, sowie für die freundlichste Unterstützung, die er mir während meiner Arbeiten in genannter Anstalt im Sommer 1913 und 1914 angedeihen ließ, auf das beste danke.

In der Litoralregion des Lunzer Untersees lebt nämlich in ziemlicher Menge eine grüne Spongie, die größtenteils

ownload from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentru

der Art *Euspongilla lacustris* angehört. Man trifft sie teils auf im Wasser liegenden Baumstämmen und Ästen sitzend, teils auf abgestorbenen Stengeln von *Schoenoplectus* und *Phragmites*, häufig hirschgeweihartig verzweigt, oder als flache Überzüge auf Steinen und Felswänden, meist von tiefgrüner Farbe. Ich fand sie hauptsächlich in Tiefen von durchschnittlich 3 bis 4 *m*, einzelne Exemplare aber selbst 10 *m* tief und darüber.

Zu den Impfungen wurden Spongien in allen mir erhältlichen Stadien verwendet, nämlich vollentwickelte Tiere, ferner die sogenannten Gemmulae, das sind die den Winter überdauernden Cysten, und Schwärmer, die Produkte der geschlechtlichen Fortpflanzung.

Castraden waren leicht zu erhalten, wenn man eine Probe aus dem Bodenschlamm der Uferregion entnahm und dann in einem Aquarium sich absetzen ließ. In dem geklärten Wasser waren dann regelmäßig etliche der lebhaft umherschwimmenden Tiere zu finden. Um mir das Auffinden der ziemlich kleinen, kaum 1 *mm* langen Turbellarien zu erleichtern und sie möglichst an einer Stelle im Aquarium zu vereinigen, benützte ich mit Rücksicht auf die beobachtete starke Phototaxis der Tiere eine künstliche Lichtquelle, am besten eine kleine elektrische Birne, die ich an die gewünschte Stelle brachte. Alsbald waren alle Castraden um dieselbe versammelt.

Während sich bei *Euspongilla* die Zoochlorellen hauptsächlich in den Zellen des Mesoderms finden, liegen sie bei *Castrada*, sowie auch bei den anderen algenführenden Turbellarien in der Oberflächenschichte des Körpers, wobei das vordere und hintere Ende des Tieres von ihnen freibleibt. Auch ist die Menge der Zoochlorellen im Verhältnis zu *Euspongilla* viel kleiner. Genaueres über den Bau der Spongillen enthalten Weltner's Spongillenstudien, über Turbellarien L. v. Graff's (2) Arbeiten.

Die bei der Kultur der Zoochlorellen angewendete Impfmethode war im allgemeinen das Koch'sche Verfahren der Isolierung auf festweichem Substrat und in Nährlösungen. Zwecks genauer mikroskopischer Kontrolle der Vermehrung

ownload from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentru

wurden Impfungen im hängenden Agartropfen und auf Agar im ausgehöhlten Objektträger vorgenommen.

Für wertvolle Ratschläge bezüglich der Technik der Kultur bin ich dem Herrn Professor Dr. Oswald Richter zu großem Dank verpflichtet.

II. Experimenteller Teil.

1. Kultur der Zoochlorella aus Euspongilla lacustris.

A. Isolierungsversuche.

Beim Beginn meiner Versuche zur Isolierung der *Zoochlorella* im Mai 1913 kamen möglichst einfach zusammengesetzte, rein mineralische Nährlösungen zur Verwendung, um vor allem den mit Sicherheit zu erwartenden Bakterien und Pilzen keine zu günstigen Ernährungsbedingungen zu bieten.

Verwendet wurden zunächst folgende Nährlösungen:

I. Wienflußwasser.
II. Wiener Leitungswasser.
III. Algenmineralsalznährlösung nach Osw. Richter (2) mit
   a) $Ca(NO_3)_2$,
   b) KNO_3.
IV. Nährlösung nach Knop.

Jede dieser vier Nährlösungen wurde mit 1·5% Agar versehen und auch als Lösung in Kölbchen zu je 50 cm^3 gebraucht. Alle vier Lösungen waren schwach alkalisch gemacht.

Die mit Agar versetzten Lösungen wurden in Petrischalen gegossen und meist in Strichform geimpft. Die Chlorellen wurden entweder vollentwickelten Spongillen und zwar von den Enden, den jüngsten und reinsten Teilen des Schwammkörpers, oder noch geschlossenen Gemmulae entnommen. In beiden Fällen wurden die Algen durch Zerquetschen und Zerreiben eines Schwammstückchens, beziehungsweise der Gemmula in einem sterilen Wassertropfen auf sterilem Objektträger befreit und die so gewonnene Algenaufschwemmung durch wiederholtes Übertragen mit der zur Öse gebogenen

ownload from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentru

sterilen Platinnadel von einem sterilen Tropfen in den anderen entsprechend verdünnt. Bei der ganzen Prozedur wurde selbstverständlich keine Vorsichtsmaßregel außer acht gelassen, um ein Einschleppen fremder Organismen zu verhindern. Die am 8. Mai geimpften Schalen und Kölbchen wurden im diffusen Licht an einem Nordfenster bei Zimmertemperatur, vor Staub sorgfältig geschützt, aufgestellt. In zwei Schalen mit Mineralsalzagar übertrug ich je eine Gemmula, deren Inhalt bereits ausgetreten war. Die Zellen des jungen Schwämmchens zeigten teilweise amöboiden Charakter und waren vollgepfropft mit lebhaft grünen und gut aussehenden Zoochlorellen.

Nach zweiwöchentlicher Kulturdauer waren auf einer mit Knop- und einer mit Leitungswasseragar beschickten Petrischale bereits makroskopisch sichtbare, schön grün gefärbte Algenkolonien zu sehen. Auf den übrigen Agarplatten waren nur Bakterien, keine Grünalgen zu bemerken. In den Kölbchen war gleichfalls noch nichts aufgekommen. Um die auf den Agarplatten ausgesetzten zwei Gemmulae hatte sich ein grüner Hof von Algen entwickelt, der, wie die Untersuchung ergab, aus Zoochlorellen bestand. Leider fand bald darauf eine überreiche Vermehrung von Bakterien statt, wahrscheinlich infolge des Absterbens der Schwämmchen, so daß von den Chlorellen bald nicht mehr viel zu sehen war.

Die mikroskopische Untersuchung der aufgekommenen Grünalgen zeigte Formen von deutlichem Chlorellatypus, wie er schon von Brandt (1) und Beyerinck (1, 2) beschrieben wurde, kugelige Gestalt mit schalenförmigem Chromatophor und hyalinem Teil, 2 oder 4 kleine Individuen, noch von der Membran der Mutterzelle umschlossen, als Teilungszustände, die größten Zellen bis 5 μ, die kleinsten 3 μ im Durchmesser. Die aus der *Spongilla* zum Vergleich entnommenen Zoochlorellen unterschieden sich nur durch die Größe, da sie nie mehr als 3 μ im Durchmesser erreichen, auch kommen neben kugeligen Zellen mindestens ebenso viele von mehr elliptischem Umrisse vor.

ownload from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentru

Infolgedessen entstanden Zweifel, ob die in der Kultur vorhandene *Chlorella* mit der *Zoochlorella* des Schwammes tatsächlich identisch sei oder ob man es mit einer zufällig aufgekommenen freilebenden Art zu tun habe.

Es wurden daher mit verschiedenen Modifikationen bis in den Sommer 1914 Abimpfungen vom Schwamme mit größtmöglichster Vorsicht durchgeführt, um zu sehen, ob die in Frage stehende Alge sich in einer größeren Zahl von Fällen ergebe, und um so die Wahrscheinlichkeit, daß sie die gewünschte sei, möglichst zu erhöhen.

So wurden von den aus der Literatur bekannten, außer den bereits erwähnten, mineralische Nährlösungen von Molisch (1, 2) [mit KNO_3 oder $PO_4(NH_4)_2H$], Beyerinck (3), Jacobsen und Artari (2), ferner Lunzer Seewasser mit Zusatz von $Ca(NO_3)_2$ oder NH_4NO_3 und K_2HPO_4 in verschiedenen Konzentrationen, dann Lunzer Seewasser mit $0 \cdot 1\%$ KNO_3, $0 \cdot 05\%$ $Ca_3(PO_4)_2$ und $0 \cdot 05\%$ $Fe_3(PO_4)_2$, in den folgenden Ausführungen der Kürze halber mit +SW+ bezeichnet, von organischen Nährböden die eben angeführten Nährmedien mit Zusätzen von Saccharose, Glukose, Dextrin, Glyzerin, Pepton und Asparagin in verschiedenen Kombinationen und Konzentrationen, sowie Agar mit Spongilla-Auszug beimpft. Aufgestellt wurden die Kulturen, vor Staub geschützt, im diffusen Lichte bei Zimmer-, Keller- oder Warmhaustemperatur. Insgesamt wurden ungefähr 50 Impfungen durchgeführt. Das Ergebnis erhellt aus folgender Tabelle:

Nährlösungen		*Chlorella* aufgekommen
Knop	+ $1 \cdot 5\%$ Agar	dreimal
Jacobsen		dreimal
Molisch	in Kölbchen à 50 cm^3 Nährlösung	dreimal
+SW+		dreimal
Beyerinck		zweimal
Jacobsen		einmal

ownload from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentru

Zusammen in 14 Impfungen außer den bereits oben angeführten zwei Fällen war also die *Chlorella* aufgetreten. Dies kann im Vergleiche zu Isolierungsversuchen ähnlicher Art als recht günstiges Ergebnis betrachtet werden. So erhielt R. Harder bei der Kultur des *Nostoc* aus *Gunnera* von mehreren hundert Impfungen nur in zwei oder drei Fällen die Alge.

Dabei zeigten sich in den verschiedenen Nährmedien bei sonst gleichem Typus Unterschiede in der Durchschnittsgröße der Chlorellen, indem in der Nährlösung von Molisch die meisten Zellen 3 μ nicht überschritten, während in der nach Jacobsen mehr Zellen von der Größe bis zu 5 μ vorhanden waren. In den Kölbchen bildeten die Algen fast immer einen dichten Bodenbelag, sich gegenseitig etwas abplattend.

In den übrigen Impfungen waren außer *Scenedesmus* in zwei Kulturen, Chlamydomonaden in dreien und Diatomeen in einer Kultur nur Pilze und Bakterien zur Entwicklung gelangt. Die Verwendung organischer Zusätze zu den Nährböden bei Originalimpfungen erwies sich wegen der starken Förderung heterotroper Mikroorganismen nicht als günstig.

Da sich wegen der Kleinheit der Zoochlorellen einzelne Zellen in Petrischalen nicht kontrollieren ließen, wurden Impfungen auf hängende Agartropfen und auf Agar im ausgehöhlten Objektträger vorgenommen. Bei diesen »Einzellkulturen« [Richter (2)] konnte allerdings Vermehrung nicht beobachtet werden. Das läßt sich aber vielleicht daraus erklären, daß der Agartropfen trotz feuchter Kammer verhältnismäßig bald, wenigstens in den äußeren Schichten austrocknete und es fraglich ist, ob gerade die beobachteten Zellen, es waren jedesmal nur fünf oder sechs, überhaupt sich zu vermehren imstande waren.

Um zu konstatieren, ob die erzielte Chlorella vielleicht dem Seewasser entstamme, wurden Kontrollversuche mit den erwähnten Nährmedien und einem Zusatz von nicht sterilisiertem Seewasser gemacht. In keinem einzigen Fall kamen Chlorellen auf.

ownload from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentru

Leider war es erst im Sommer 1914 in der biologischen Station in Lunz möglich, Spongienschwärmer als Impfmaterial zu erhalten. Bei diesen ist nämlich die Gefahr, durch etwa außen anhaftende oder im Innern enthaltene freilebende Chlorellen getäuscht zu werden, bei der nötigen Vorsicht kaum zu fürchten.

Die Schwärmer haben die Form der Blastula und sind vollständig bewimpert. Sie bewegen sich rotierend in der Richtung der Hauptachse. In den Zellen der rückwärtigen Hälfte finden sich regelmäßig Zoochlorellen. Von etwa außen anhaftenden grünen Mikroorganismen, die übrigens wohl auch unschwer unter dem Mikroskop zu finden gewesen wären, wurden die Schwärmer durch wiederholtes Übertragen von einem sterilen Wassertropfen in den andern gereinigt, dann im sterilen Tropfen zerrieben und davon abgeimpft.

Eine Kontrolle der in den letzten Tagen des Juli 1914 aufgestellten Kulturen war nur bis zum 10. August aus den bereits erwähnten Ursachen möglich. Bis dahin konnte keine Vermehrung bemerkt werden.

Der sicherste Beweis für die Identität der *Zoochlorella* mit der in Kultur gehaltenen Alge wäre wohl eine mit Erfolg durchgeführte Infektion algenfreier Spongillen mit dem Kulturmaterial gewesen. Von derartigen Infektionsversuchen war ja bereits in der Einleitung die Rede.

Um zu sehen, ob die *Spongilla* vielleicht durch Verdunklung farblos, d. h. algenfrei würde, wurde im Frühjahre 1914 an einer geeigneten Stelle im See ein Spongienstock mit einem innen schwarzlackierten Holzkasten überdeckt. Der Kasten hatte doppelte Seitenwände mit Öffnungen am unteren Teil der Außen- und oberen Teil der Innenwände, um eine Zirkulation des Wassers zu ermöglichen. Leider konnte auch das Ergebnis dieses Versuches nicht abgewartet werden.

Ähnliche Schwierigkeiten der sicheren Identifizierung wie im vorliegenden Falle finden sich, wie aus der Literatur ersichtlich, so ziemlich bei allen ähnlichen Kulturversuchen mit Mikroorganismen, die so unsichere, wenig eindeutige morphologische Merkmale aufweisen wie die Chlorellen. Dazu kommt noch die geringe Größe der Algen, so daß im Hin-

ownload from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentru

blick auf diese Eigenschaften die Bezeichnung »grüne Bakterien« einigermaßen verzeihlich erscheint.

Selbst Beyerinck (1, 3) bezweifelte bei der völligen äußeren Übereinstimmung der freilebenden *Chlorella vulgaris* mit seiner kultivierten Hydrachlorella die Echtheit der letzteren.

Gerade in der Systematik der Chlorellen herrscht auch heute noch eine ziemliche Unsicherheit. So wirft Oltmanns die Frage auf: »Wieviel *Chlorella*-Arten gibt es?«

Von symbiotisch lebenden Chlorellen haben Brandt (1) und Beyerinck (1) zwei Arten unterschieden: *Chlorella parasitica* (Größe 1·5 bis 3 μ) in Spongillen und *Chlorella conductrix* (Größe 3 bis 6 μ) in *Hydra* und Infusorien. Famintzin entdeckte in Infusorien eine Art, die er wegen ihrer Größe (bis 12 μ) *Zoochlorella maxima* nannte. Die Frage der eventuellen morphologischen Identität dieser Formen mit freilebenden Arten wurde wiederholt erörtert.

Artari (2) hat bei *Chlorella communis* Veränderungen in den Größenverhältnissen, hervorgerufen durch die Nährmedien, insbesondere durch verschiedene Konzentrationen derselben festgestellt.

Ähnliche Erscheinungen der Variabilität je nach dem Nährmedium hat Grintzesco bezüglich der bei der Vermehrung auftretenden Anzahl von Tochterzellen der *Chlorella vulgaris* gefunden.

Schließlich kommt Nils Svedelius auf Grund seiner Untersuchungen an den von ihm entdeckten Zoochlorellen einer marinen Hydroide und der erwähnten vorangegangenen Beobachtungen zu dem Schluß über die Chlorellen, »daß endlich die Größenverhältnisse ein konstantes Artmerkmal darstellen sollten, läßt sich schwerlich aufrecht erhalten. Alle, welche diese Algen in Kultur gehabt haben, haben ja auf ihr Schwanken in dieser Hinsicht hingewiesen. Es lassen sich also jedenfalls keine morphologischen Merkmale als Unterscheidungszeichen zwischen den endophytischen und den freilebenden *Chlorella*-Arten aufstellen.«

Es ist also bei den Chlorellen zweifellos eine gewisse Variabilität der morphologischen Merkmale möglich. Bedenkt man nun, daß die *Zoochlorella* in der Spongie sicher unter

ownload from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentru

ganz spezifischen Lebensbedingungen vegetiert, die sich in der künstlichen Kultur kaum nachahmen lassen, so ist eine Gestalts- und Größenveränderung der Alge in diesem Falle wohl nicht ausgeschlossen.

Trotzdem muß zugegeben werden, daß ohne gelungene Einzelkultur, beziehungsweise Infektion einer farblosen Spongie mit der gezüchteten Alge ein vollkommen einwandfreier Beweis für ihre Identität mit der *Zoochlorella* des Tieres nicht geliefert ist.

B. Die Reinzucht.

Die auf Knop-Agar gewonnene *Chlorella* wurde in weitere Kultur genommen, mit dem Endziele, sie absolut rein zu erhalten. Dabei erwies es sich als ziemlich langwierig, sie von den unerwünschten Organismen zu trennen, einmal wegen ihrer Kleinheit und weil es ziemlich lange dauerte, bis die Kolonien in den Ausgußkulturen groß genug geworden waren, um sie mit freiem Auge auffinden und davon abimpfen zu können. Besonders den Winter über war das Wachstum begreiflicherweise ein recht geringes. Als besonders günstig für die Entwicklung der *Chlorella* stellte sich die Nährlösung von Jacobsen mit 0·02% NH_4NO_3, 0·02% K_2HPO_4 und 0·01% $MgSO_4$ heraus. Andrerseits wuchsen auf dem oben mit +SW+ bezeichneten Nährboden am wenigsten Bakterien. Durch zwischen den beiden Nährböden abwechselnde, fraktionierte Impfung gelang es endlich im März 1914, eine sehr rein aussehende Kultur zu erzielen. Davon wurde zunächst auf Jacobsen-Agar mit 0·5% Asparagin überimpft. Die Algen wuchsen darauf völlig frei von anderen Mikroorganismen. Die absolute Reinkultur war somit erreicht. Weitere Probeimpfungen auf Nährböden mit Glukose bestätigten dieses Ergebnis.

C. Verhalten der Chlorella gegen einige organische Nährstoffe.

Die ernährungsphysiologischen Versuche mit der reinkultivierten Alge konnten wegen des Kriegsausbruches nur

ownload from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentru

bis zu einem gewissen Grad fortgesetzt werden. Im folgenden seien einige Befunde mitgeteilt:

Stammlösung:

$0{\cdot}02\%$ NH_4NO_3,
$0{\cdot}02\%$ K_2HPO_4,
$0{\cdot}01\%$ $MgSO_4$

mit je $0{\cdot}5\%$ Saccharose, Glukose, Galaktose oder mit je $0{\cdot}5\%$ Pepton, Asparagin an Stelle von NH_4NO_3 in Kölbchen zu je 50 cm^3 Lösung, aufgestellt bei Zimmertemperatur, in diffusem Lichte, geschützt vor Staub.

Von den Kohlehydraten förderte die Entwicklung am meisten Glukose. Nach einwöchentlicher Kulturdauer war die Algenmasse etwa vier- bis fünfmal so groß wie in der gleichzeitig zum Vergleich beimpften rein mineralischen Stammlösung. Galaktose ließ nach einer Woche noch keine fördernde Wirkung gegenüber der Kontrollkultur wahrnehmen. In Saccharose war merkwürdigerweise bis auf ein Kölbchen mit kaum merklichem Algenanflug überhaupt noch nichts aufgekommen.

Asparagin wirkte entschieden besser als Pepton, doch scheint die *Chlorella*, soweit nach den wenigen Versuchen und der kurzen Beobachtungsdauer geschlossen werden darf, überhaupt keine besondere Vorliebe für organische Stickstoffquellen zu haben. Aber jedenfalls müßte dies noch durch weitere Impfungen bestätigt werden.

Mitgeteilt verdient vielleicht die Beobachtung zu werden, daß auf Gelatine mit Pepton, Dextrin, Fleischextrakt ein Verblassen der grünen Farbe bei den Chlorellen einsetzte, dabei war das Wachstum ein ziemlich langsames.

Gegenwärtig im Frühjahr 1918 habe ich die *Chlorella* zwar noch in Kultur, doch bedarf es erst einer genauen Überprüfung, ob sie noch absolut rein ist. Auch ist vielleicht nicht ausgeschlossen, daß sie durch die lange Kulturdauer ihre ursprünglichen ernährungsphysiologischen Eigenschaften wenigstens teilweise geändert hat.

ownload from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentru

2. Isolierung der Chlorella aus Castrada viridis.

Die in *Castrada* vorgefundene *Chlorella* unterscheidet sich von den Zoochlorellen der *Spongilla* vor allem durch ihre Größe. Die Zellen haben einen durchschnittlichen Durchmesser von 5 μ, einzelne messen sogar bis 8 μ. Der schalenförmige Chromatophor ist mitunter zwei- bis dreilappig, manchmal kleiner als der hyaline Teil der Zelle. Die Farbe ist eine hell- bis fast gelblichgrüne. Im Innern des Tieres platten sich die Zoochlorellen gegenseitig etwas ab, befreit, nehmen sie Kugelform an.

Die ersten Isolierungsversuche wurden im September 1913 in der biologischen Station in Lunz gemacht. Zur Verwendung kamen die bereits auf Seite 400 und 402 angeführten Nährböden mineralischer Art.

Die mikroskopische Untersuchung der auf einer mit der Nährlösung nach Molisch (1, 2) beschickten Agarplatte nach einmonatlicher Kulturdauer entwickelten Grünalgenkolonien ergab Chlorellen, die sich von den Zoochlorellen des Turbellars nicht unterschieden, dagegen durch ihre Größe und die bereits in den Kolonien makroskopisch wahrnehmbare hellere Färbung des Chlorophylls mit den bei den Impfungen aus *Spongilla* gewonnenen Algen nicht zu verwechseln waren.

Im ganzen wurde bis in den Sommer 1914 vierzigmal von *Castrada* abgeimpft. In 35 Kulturen kamen dieselben Chlorellen auf und zwar auf Agar und in Flüssigkeitskulturen mit den Nährlösungen nach Molisch, Richter, Knop und mit +SW+.

Eine Kultur in Nährlösung nach Molisch [mit $(NH_4)_2HPO_4$ als Stickstoffquelle] wurde als Stammkultur für die Reinzuchtversuche gewählt, da die *Chlorella* darin am besten wuchs. +SW+ hatte auch hier die günstige Eigenschaft, das Aufkommen von Bakterien stark hintanzuhalten. Doch zeigten die Algen bei längerer Kultur darin Degenerationserscheinungen, indem der Chromatophor körnelig wurde und zerfiel. Viele Zellen sahen mit stark vergrößertem hyalinen Teil blasig aufgetrieben aus.

ownload from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentru

Auch hier wurde daher das oben angegebene Verfahren der Wechselimpfung durchgeführt. Das Endergebnis war anfangs August 1914 eine sehr rein aussehende Kultur mit prächtig entwickelten Kolonien.

Die Probeimpfung auf organisches Nährsubstrat konnte aber nicht mehr durchgeführt werden und die schöne Kultur blieb ihrem Schicksal des Verderbens überlassen.

Zusammenfassung.

Bei den Kulturversuchen mit der *Zoochlorella* aus *Euspongilla lacustris* konnte auf rein mineralischen Nährböden eine *Chlorella* isoliert werden. Deren Identität mit ersterer war zwar nicht vollkommen einwandfrei festzustellen. Sie ist aber durch das Aufkommen in einer größeren Anzahl von Kulturen, sowie im Hinblick auf die von mehreren Forschern beobachtete Variabilität der Gattung *Chlorella* und die spezifischen Lebensbedingungen der *Zoochlorella* in der *Spongie*, die sich in künstlicher Kultur nicht nachahmen lassen, trotz geringer Unterschiede in Größe und Gestalt ziemlich wahrscheinlich.

Die absolute Reinkultur der *Chlorella* wurde durch fraktionierte Impfung erzielt. Dabei wurden abwechselnd zwei Nährböden verwendet, von denen der eine für die Unterdrückung der Bakterien und Pilze, der andere für die rasche Entwicklung der Alge besonders günstig war.

Als Ergebnis der mit der Reinkultur begonnenen ernährungsphysiologischen Versuche konnte die stark fördernde Wirkung von Glukose konstatiert werden. Das Bedürfnis der Alge nach organischen Stickstoffverbindungen dürfte ein geringes sein. Kultur auf Gelatine mit Pepton, Dextrin, Fleischextrakt bewirkte ein Verblassen der grünen Farbe.

Die bei den Isolierungsversuchen mit der *Zoochlorella* von dem Turbellar *Castrada viridis* gewonnene *Chlorella* gleicht im Aussehen völlig der Alge des Wurmes und ist

ownload from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentru

von den aus *Euspongilla* erhaltenen Chlorellen deutlich verschieden.

Das Reinzuchtverfahren mit dieser Alge, nach der gleichen Methode wie bei der *Spongilla-Chlorella* durchgeführt, mußte knapp vor dem Erfolge wegen des Krieges fallen gelassen werden.

Literaturverzeichnis.

Artari A.: 1. Zur Frage der physiologischen Rassen einiger Grünalgen. — Ber. d. deutschen Bot. Ges., Bd. XX, 3. 1902.

— 2. Der Einfluß der Konzentration der Nährlösungen auf die Entwicklung einiger grüner Algen. — Pringsh. Jahrb. f. wissensch. Bot., Bd. 43, p. 177.

Beyerinck M. W.: 1. Kulturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. Bot. Zeitg. 1890, H. 45 bis 48.

— 2. Bericht über meine Kulturen niederer Algen auf Nährgelatine. Zentralbl. f. Bakt. u. Paras. K., 2. Abt. 13., 1893.

— 3. Notiz über Pleurococcus vulgaris. Ebenda Bd. 4, 1898, p. 785.

Biedermann: Physiologie des Stoffwechsels. Winterstein, Handbuch d. vergl. Physiologie. Bd. II, Jena 1911.

Brandt K.: 1. Über die morphologische und physiologische Bedeutung des Chlorophylls bei Tieren. Archiv f. Anatomie u. Physiologie, Physiol. Abt. 1882. H. 1 u. 2, Mitteilungen aus der zool. Station zu Neapel. Bd. IV, 1883, p. 191.

— 2. Über das Zusammenleben von Algen und Tieren. Biolog. Zentralbl. 1881, p. 524.

Entz G.: 1. Über die Natur der Chlorophyllkörperchen niederer Tiere. Biolog. Zentralbl. 1881, 1.

— 2. Das Konsortialverhältnis von Algen und Tieren. Biolog. Zentralbl. 1882, 2.

ownload from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentru

Famintzin A.: Beitrag zur Symbiose von Algen und Tieren, Mém. de l'Academie d. sc. de St. Pétersbourg. T. 36, 1 1889 u. T. 38.

Geddes P.: On the nature and functions of the »yellow cells« of Radiolarians and Coelenterates. Proceed of Roy Soc. Edinburgh 1882.

v. Graff L.: 1. Zur Kenntnis der physiologischen Funktion des Chlorophylls im Tierreich. Zoologisch. Anzeiger 1884, 7, p. 520.

— 2. Die Organisation der Turbellaria acoela. Mit einem Anhang über den Bau und die Bedeutung der Chlorophyllzellen von Convoluta Roscoffensis von G. Haberlandt. Leipzig 1891.

Grintzesco J.: Contribution à l'étude des Protococcacées Chlorella vulgaris Beyer. Revue générale de Botanique T. 15, Paris 1903.

Haberlandt: Siehe unter v. Graff.

Jacobsen H. C.: Kulturversuche mit einigen niederen Volvocaceen. Zeitschr. f. Bot. 1910, p. 145.

Kessler: Zoochlorella, ein Beitrag zur Lehre von der Symbiose. Archiv f. An. u. Phys., Abt. f. Physiologie 1882, p. 490.

Küster E.: Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen. Leipzig u. Berlin 1907.

Lankester R.: 1. The Chlorophyll-corpuscles of Hydra-Nature Vol. 27, 1882.

— 2. On the Chlorophyll-corpuscles and Amyloid deposits of Spongilla and Hydra. Quart. Journ. of micro. Sc. 1882.

Molisch H.: 1. Ernährung der Algen. I. Sitzb. d. kais. Akad. d. W. in Wien, Math.-naturw. Kl., Bd. 104, Abt. 1, Okt. 1895, p. 783.

— 2. Die Ernährung der Algen. Okt. 1896. Ebenda Bd. 105, Abt. 1, p. 633.

Oltmanns F.: Morphologie und Biologie der Algen. Jena 1905, II. Bd., p. 361 ff.

Pringsheim E.: Die Kultur von Paramaecium Bursaria. Biol. Zentralbl., Bd. XXXV, 8, 9.

Richter Osw.: 1. Die Ernährung der Algen. Leipzig 1911. (Monographien und Abhandlungen zur internatio-

ownload from The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biologiezentru

nalen Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie.)

Richter Osw. 2. Die Reinkultur und die durch sie erzielten Fortschritte vornehmlich auf botanischem Gebiete. Progressus rei Botanicae. Jena 1911, Bd. 4, p. 310 u. 314.

Schewiakoff W.: Bemerkungen zu der Arbeit von Prof. Famintzin über Zoochlorellen. Biologisches Zentralbl. 1891, XI, p. 475.

Schultze F. E.: Untersuchungen über den Bau und die Entwicklung der Spongien. VIII. Mitteil. Zeitschr. f. wiss. Zoologie, Bd. 33, 1879.

Siebold v.: Über einzellige Pflanzen und Tiere. Ebenda, Bd. 1 (1847).

Svedelius Nils: Über einen Fall von Symbiose zwischen Zoochlorellen und einer marinen Hydroide. Särtryk ur Svensk Botanisk Tidskrift 1907, Bd. 1.

Weltner W.: Spongillidenstudien II und III. Archiv f. Naturgeschichte, Jahrg. 1893, 1 u. 1895, 1.

Wöhler: Über O-Entwicklung aus dem organischen Absatz eines Solwassers. Ann. d. Chem. u. Pharm., Bd. 15, (1843).